

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

⑫ Date de dépôt : 01.12.89.

⑬ Priorité :

⑭ Date de la mise à disposition du public de la  
demande : 28.06.91 Bulletin 91/26.

⑮ Liste des documents cités dans le rapport de  
recherche : *Se reporter à la fin du présent fascicule.*

⑯ Références à d'autres documents nationaux  
apparentés :

⑰ Demandeur(s) : PARACELSE (SARL) — FR.

⑱ Inventeur(s) : Buvet René, Moutet Marc et Banissi  
Claire.

⑲ Titulaire(s) :

⑳ Mandataire : Bugnion Associés Département GEFIB.

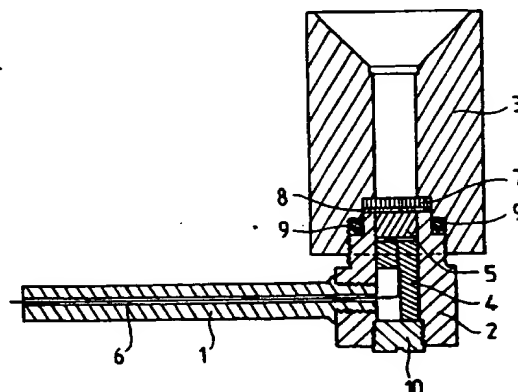
① Procédé d'électro-analyse rapide des liquides biologiques, dispositif utilisé à cet effet et applications dans le  
domaine biologique.

② L'invention se rapporte au domaine de la chimie et  
plus particulièrement à celui de la chimie biologique.

Elle a en particulier pour objet, un procédé d'électro-  
analyse rapide des liquides biologiques par voltammétrie  
cyclique à balayage linéaire de potentiel sur électrode po-  
reuse de graphite qui consiste en ce que l'on soumet  
l'échantillon à analyser, présent dans la capillarité du gra-  
phite, sans séparation préalable, après un premier ba-  
layage de potentiels, à un second balayage et éventuelle-  
ment à un troisième balayage aller et retour et en ce qu'on  
enregistre les pics nouveaux apparus.

L'invention concerne aussi le dispositif de voltammétrie à  
électrode de graphite utilisé pour la mise en œuvre du pro-  
cédé d'électro-analyse de l'invention.

Application du procédé selon l'invention à la détection  
et/ou le dosage dans les liquides biologiques de catabolites  
de neuromédiateurs, de substances du métabolisme, de  
substances toxiques ou illicites.



FR 2 656 424 - A1



BEST AVAILABLE COPY

- 1 -

PROCEDE D'ELECTRO ANALYSE RAPIDE DES LIQUIDES BIOLOGIQUES,  
DISPOSITIF UTILISE A CET EFFET  
ET APPLICATIONS DANS LE DOMAINE BIOLOGIQUE

5 La présente invention se rapporte au domaine de la chimie et plus particulièrement au domaine de la chimie biologique.

Elle a en particulier pour objet, un procédé d'électro-analyse rapide des liquides biologiques et le dispositif d'électro-analyse  
10 utilisé à cet effet.

La présente invention concerne plus précisément un procédé de détection et de dosage dans les liquides biologiques de substances chimiques organiques, normales ou anormales, anodines ou pathologiques dont la présence indique soit le fonctionnement  
15 normal des processus biologiques, soit au contraire, la survenue d'une détérioration du métabolisme liée à la présence d'un agent extérieur ou d'un mécanisme pathogénique interne.

La plupart des liquides d'origine biologique comme l'urine, le plasma, le liquide céphalo-rachidien, le liquide synovial, mais aussi les jus de fruits, solutions d'extraction de végétaux, ..  
20 contiennent de nombreux composés organiques, de structures aromatiques, qui peuvent être oxydés ou réduits par voie électro-chimique, à des potentiels variés, compris entre le  
25 potentiel de réduction de l'oxygène vers +0,10 V/E.N.H et le potentiel d'oxydation de l'eau.

La littérature antérieure indique que le dosage par oxydation ou réduction électrochimique sans séparation préalable de ces  
30 composés est rendu difficile, ou même dans certains cas, impossible, dans la mesure où les domaines de potentiel dans lesquels ces réactions ont lieu, se superposent en général lorsque plusieurs de ces composés électroactifs se trouvent présents simultanément. Par contre, ce dosage est pratiqué après séparation  
35 préalable de ces composés, par exemple d'une manière courante à l'aide d'une technique chromatographique. Ceux-ci peuvent alors être oxydés, par exemple, successivement au fur et à mesure de leur sortie de la colonne chromatographique sur une

électrode détectrice polarisée à un potentiel suffisamment élevé pour les oxyder en totalité. Ces procédés d'analyse restent toutefois relativement onéreux et lents, du fait de la mise en oeuvre d'un appareillage approprié pour réaliser la séparation préalable.

5

Par ailleurs, parmi les techniques coulométriques, la voltammétrie cyclique à balayage linéaire de potentiel de polarisation, à des vitesses de l'ordre de quelques millivolts par seconde, de solutions imprégnant la capillarité d'électrodes constituées de poudre compactée de carbone électrochimiquement inerte, de granulométrie à l'échelle de quelques microns, dites à pâte de carbone, permet classiquement de mettre en évidence les propriétés d'électroactivité de nombreux composés de structures variées, et de déterminer la concentration de ceux-ci, lorsque les solutions étudiées contiennent un seul composé, ou un petit nombre de composés oxydables à des potentiels suffisamment différents. Selon ce procédé, la très faible quantité de composé électroactif contenue dans la solution imbibant les interstices compris entre les grains de carbone est électrolysée, lorsque le potentiel atteint la valeur convenable, sur la très grande surface développée de la poudre de graphite (celle-ci étant typiquement de plusieurs  $\text{m}^2/\text{g}$ , en quelques secondes, c'est-à-dire avant que le potentiel ne soit modifié de façon importante et sans que le composé électroactif contenu dans cette capillarité ait le temps d'être échangé avec la solution imbibant l'amas de pâte de carbone qui constitue l'électrode. Dans ces conditions, la variation du courant enregistré en fonction du potentiel, ou du temps, présente la forme d'un pic, dont le potentiel du maximum correspond, pour un composé oxydable d'une manière réversible, au potentiel normal apparent d'oxydo-réduction de ce composé-. Si, après oxydation totale du composé en question, le sens de variation du potentiel est inversé, par exemple avec la même vitesse de balayage, la forme oxydée du composé, maintenant présente dans l'électrode, est réduite avec une variation du courant avec le potentiel inverse de celle imposée au balayage aller, dans la mesure où cette forme oxydée n'a pas eu le temps de diffuser hors de la capillarité de la pâte de graphite. Toutefois, de nombreux composés organiques électrochimiquement oxydables subissent, après oxydation, des

35

30

25

20

15

10

réactions chimiques irréversibles qui modifient leur structure aromatique et, par conséquent, leurs propriétés électrochimiques. En particulier, pour ces composés, le pic de réduction n'apparaît plus au balayage retour.

5       Lorsqu'on tente toutefois d'appliquer ce procédé à l'analyse des  
liquides biologiques, en particulier des urines, sans séparation  
préalable des différents composés électroactifs qu'ils  
contiennent, la plupart de ceux-ci s'oxydent à des potentiels trop  
10       voisins les uns des autres, pour donner lieu à la formation de  
pics séparés, et l'enregistrement de la variation du courant avec  
le potentiel ne permet alors pas de déterminer les concentrations  
de la plupart des composés présents. A titre d'exemple, la  
figure 1 donne l'enregistrement de cette variation pour une urine  
15       d'adulte sain, acidifiée à pH 1 par addition d'acide  
chlorhydrique, à l'aide d'une électrode constituée de 200 mg de  
poudre de graphite inerte de granulométrie 200 mesh, compactée  
dans le dispositif représenté dans la Planche 1. On note que la  
plupart des composés oxydables le sont à des potentiels supérieurs  
20       à 800 mV/E.N.H, donc dans un intervalle de potentiel resserré  
entre cette valeur et le potentiel d'oxydation de l'eau, situé  
ici, vers 1300 mV/E.N.H, et que de ce fait, l'enregistrement  
obtenu ne permet pas d'effectuer une discrimination nette de la  
majorité des pics d'oxydation les uns par rapport aux autres.

25       La présente invention concerne un procédé qui vise donc à pallier  
cette difficulté et se rapporte aux appareillages d'analyse  
mettant en application ce procédé. Selon le procédé, objet de  
l'invention, après réalisation d'un premier balayage aller et  
retour, à l'aide soit d'un générateur potentiostatique à trois  
30       électrodes, soit d'un simple générateur de tension continue  
régulée avec utilisation d'une contre-électrode susceptible de  
débiter quelques mA sans changement notable de potentiel, on  
procède à un second balayage et, le cas échéant à un troisième  
balayage aller et retour, entre les mêmes bornes de potentiel ou  
35       des bornes différentes et les courants d'électrolyse mis en jeu  
durant ces balayages sont enregistrés. Dans ces conditions, on  
relève sur l'enregistrement de la variation du courant avec le  
potentiel correspondant au second balayage aller et retour, et, le

- 4 -

cas échéant au troisième, des pics correspondant à des propriétés d'oxydo-réduction nouvelles des produits des transformations chimiques irréversibles des formes oxydées des composés initialement présents, obtenues au cours du premier balayage aller. Ces pics se situent en général à des potentiels inférieurs à ceux des oxydations initiales correspondantes, et sont de ce fait, plus distants les uns des autres que ceux obtenus précédemment. Par ailleurs, l'information complémentaire que ces pics apportent, permet souvent de disjoindre des contributions superposées dans le voltammogramme enregistré pour le premier balayage.

L'invention concerne également un dispositif d'électroanalyse qui permet le double balayage aller et retour et éventuellement, un troisième balayage aller et retour.

Il comprend, ainsi que représenté Planche 1, une cellule d'analyse (3) qui reçoit le liquide à analyser sans purification ou séparation préliminaire dans laquelle est disposé un disque de verre fritté (7) contre lequel est pressée l'électrode de mesure constituée d'une couche de poudre de graphite compactée (8) et d'un disque de graphite (5) assujetti au bati de la cellule (2) et auquel est connecté, d'une manière fixe, un collecteur de courant (6) monté d'une manière étanche à la partie inférieure de la cellule d'analyse (3).

Une contre électrode et une électrode de référence, non représentées, sont plongées dans le liquide à analyser qui est versé dans la cellule d'analyse, et de ce fait, pénètre la capillarité de la poudre de graphite (8).

La contre électrode d'oxydo-réduction est constituée par un fil de métal noble de la famille du platine comme par exemple un fil de platine, de palladium ou d'iridium.

Selon un mode d'exécution actuellement préféré et figuré sur la planche n° 1, la cellule d'analyse est montée serrée sur le bati (2) supportant le disque de verre fritté et la partie graphitée, par l'intermédiaire d'un filetage porté à la partie supérieure

dudit bati. L'étanchéité de ce bati est également assurée par un moyen d'étanchéité disposé à la partie inférieure du bati comme par exemple au bouchon ou un joint d'étanchéité (10) maintenu par un dispositif de serrage tel que filetage, cannelures ou rodage.

5 La rigidité de l'ensemble bati-cellule d'analyse est obtenue par la présence d'une entretoise (4) et du joint d'étanchéité torique (9 et 9').

10 Le volume de la cellule d'analyse est de quelques ml et plus précisément varie de 0,5 à 5 ml. L'intensité relevée sur l'électrode de mesure ou sur la contre électrode est de quelques mA et plus précisément de 0 à 10 mA. Le débit de ce courant d'analyse s'effectue par l'intermédiaire d'un générateur non  
15 figuré sur le dessin qui fournit ce courant électrolyse à potentiel croissant à une vitesse linéaire dans le sens des potentiels positifs puis des potentiels négatifs et inversement.

20 Un dispositif d'enregistrement non figuré connecté à l'électrode de graphite par le moyen du collecteur de courant permet de détecter ou d'enregistrer les variations de potentiel au fur et à mesure des balayages aller et retour.

25 L'électrode de mesure, schématisée sur la planche 1, est ainsi constituée d'un empilement de poudre très fine de graphite, compactée d'une façon géométriquement reproductible entre un collecteur massif de graphite et un verre fritté permettant l'imprégnation de la poudre de graphite et laissant passer le courant ionique vers la solution où se trouve une contre-électrode  
30 collectrice de ce courant.

35 La surface développée des grains de graphite peut être évaluée, pour 200 mg du graphite électrochimiquement inerte utilisé, à environ  $7 \text{ m}^2$  et le volume de solution électrolytique, correspondant au remplissage des pores intersticiels, qui va être traité par oxydation électrochimique est de l'ordre de  $1/10^{\text{e}}$  de millilitre. Ceci inverse tout à fait le rapport de la surface de l'électrode et du volume de solution électrolysée par rapport aux méthodes d'analyse électrochimique dites polarographiques ou coulométriques.

- 6 -

5 Cette contre-électrode de mesure est insérée dans un circuit potentiostatique permettant d'en fixer le potentiel à des valeurs variables linéairement dans le temps, entre deux bornes correspondant respectivement à la réduction et à l'oxydation du milieu électrolytique utilisé. Ce balayage est effectué à une vitesse fixée en général à 1 V/200 s par potentiels croissants, avec retour à la même vitesse à la borne inférieure, et suivi d'un second balayage aller et retour identique, et, si utile, d'un troisième.

10 Compte tenu de la vitesse de balayage utilisée et des faibles quantités de substrats piégés dans l'électrode à des distances très faibles des parois des grains de graphite, les transferts électrochimiques s'expriment donc sur les tracés sous la forme de  
15 pics traduisant la consommation par électrolyse des composés électroactifs contenus dans la pâte de graphite.

20 En variante du dispositif décrit ci-dessus, la contre-électrode en métal inattaqué, peut être une électrode de référence, de préférence en argent chloruré, de surface suffisante pour débiter des courants de l'ordre de quelques mA sans variation notable du potentiel d'électrode.

25 Le dispositif selon l'invention peut en outre comporter une commande de potentiel et de relevé du courant par commande informatisée, à l'aide d'un micro-ordinateur équipé d'une interface entrée/sortie digitale-analogique avec exploitation informatisée des Voltammogrammes obtenus pour l'identification et la mesure de la concentration des composants de l'échantillon.

30 Deux balayages successifs ou même trois balayages effectués sur une telle électrode en équilibre d'imprégnation avec une urine à étudier permettent ainsi d'obtenir des tracés qui se présentent sous la forme d'une succession de pics plus ou moins séparés et  
35 d'amplitudes variées, en principe proportionnels aux concentrations qui reflètent immédiatement, sans séparation préalable, d'une façon très visuelle, la présence des différents composés urinaires électroactifs, chacun à un potentiel qui le caractérise.

- 7 -

Comme exposé précédemment, le procédé d'électro-analyse selon l'invention trouve de nombreuses applications en biologie. Il permet de détecter même à l'échelle du nanogramme/ml, la présence de catabolites neuromédiateurs ou de substances du métabolisme, dans le sang, l'urine, le liquide céphalo-rachidien, la salive, le liquide synovial, le plasma sanguin, ... Il permet de détecter ou de doser, dans ces mêmes liquides biologiques, la présence des produits biologiques normaux (bases puriques, acides aminés, protéines, cholestérol, les vitamines, les hormones) ou anormaux, tels que poisons, drogues ou toxines.

Il permet encore d'étudier le métabolisme ou le devenir dans l'organisme de médicaments en fonction de la voie d'administration, de la voie d'excrétion et de la dose administrée.

Il permet aussi de déterminer en fonction de l'âge, en particulier du foetus aux personnes âgées, l'évolution de l'excrétion et du métabolisme des produits biologiques.

Ce procédé constitue donc, à la fois, un mode de détection extrêmement sensible de substances spécifiques normales ou anormales dans l'organisme, et un mode d'évaluation de la présence de substances dont l'insuffisance ou l'excès peuvent constituer un phénomène pathologique.

La figure 3 fournit, à cet égard, les différences de détection au cours de deux balayages aller et retour successifs d'une urine de sujet normal. Elle met en évidence l'apparition de pics tout à fait spécifiques correspondants à l'acide urique, et à l'acide 5-hydroxy indolyl acétique urinaire.

- 8 -

C'est ainsi que les figures 2a et 2b représentent respectivement les voltammogrammes enregistrés, à l'aide du dispositif selon l'invention, aux premiers et seconds balayages aller et retour, pour une urine de patient sain après prise d'ascorbate de sodium, acidifiée à pH 1. Les potentiels d'oxydation anodique ou de réduction cathodique des principaux composants électroactifs présents dans une telle urine normale, ou des produits de transformation de leurs formes oxydées obtenues au premier balayage, ont été portés sur ces figures. Les amplitudes des pics correspondants sont proportionnelles aux concentrations de ces composants. On notera que les composants ainsi détectés sont principalement : les produits du catabolisme des bases puriques (urate), ainsi que la tyrosine et le tryptophane et les catabolites des neuromédiateurs dérivés de ceux-ci (5-HIA, VMA, HVA, xanthurénate ..), l'ascorbate et l'oxalate, composants qui, pour la plupart, constituent des marqueurs d'état physiologiques particuliers ou d'affections variés.

5-HIAA = acide 5-hydroxy indole acétique

VMA = acide Vanillylmandelique

HVA = Acide homovanillique

Xanthurénate = Acide Xanthurénique

Trp = Tryptophane

Un autre exemple d'utilisation du dispositif selon l'invention réside dans le dépistage d'affections variées par modification des amplitudes de pics présents dans les urines d'adultes sains, les figures 4, 5 et 6 représentent respectivement les voltammogrammes relevés :

- pour la première miction d'un nouveau né sain, dont le métabolisme des neuromédiateurs n'est pas encore entièrement établi ;

- pour une miction de nouveau-né affecté d'une réaction inflammatoire pulmonaire ;

- pour des mongoliens, nouveau-nés aussi bien qu'adultes.

- 9 -

Les variations d'amplitudes des pics correspondant à la tyrosine, au tryptophane et aux catabolites des neuromédiateurs qui en dérivent, sont évidentes sur ces tracés. Elles peuvent être quantitativement appréciées, indépendamment du flux urinaire, par le calcul des rapports d'amplitudes des pics correspondant aux différents composants de l'urine.

Le procédé proposé apparaît toutefois bien plus intéressant encore pour dépister des états physiologiques anormaux lorsque ceux-ci se traduisent par l'apparition de pics non présents dans les voltammogrammes urinaires normaux.

A titre d'exemples non limitatifs, les figures 7 à 10 représentent des modifications observées d'une manière systématique dans différents états pathologiques ou à la suite de l'administration de produits à caractère médicamenteux ou de drogues stupéfiantes.

La figure 7, relative à un prélèvement urinaire effectué au cours d'une crise de goutte, indique la présence d'un pic très intense d'oxydation vers 1200 mV/E.N.H, oblitéré en particulier par les pics d'oxydation de la tyrosine, du tryptophane et de l'oxalate et par conséquent, non quantitativement exploitable, mais également celle de pics d'oxydo-réduction, réversibles, de produits de transformation après oxydation du constituant urinaire correspondant à ce pic d'oxydation, nettement caractérisables sur l'enregistrement du second balayage à 950 mV/E.N.H, potentiel auquel aucun autre composé ne réagit au second balayage, ainsi qu'à 750 et 570 mV/E.N.H.

La Figure 8, représente un voltammogramme urinaire typique de patient atteint de démence du type Alzheimer. On y note que le tracé de retour de second balayage fait apparaître, à 850 mV/E.N.H, un pic d'amplitude nettement réduite par rapport à celle du pic relevé au même potentiel au cours du premier balayage retour. Cette réduction d'amplitude correspond à un produit d'oxydation obtenu au premier balayage vers 1200 mV/E.N.H, dont la présence est attestée par l'augmentation de l'amplitude du pic de réduction observé au premier balayage retour, et dégradé à son tour par le second passage dans cette même zone de potentiel.

- 10 -

5 A titre d'exemple supplémentaire des capacités d'exploitation du procédé préconisé en diagnostic médical, on peut encore noter que les voltammogrammes du liquide céphalo-rachidien du même type de patients font apparaître une forte réduction des concentrations en ascorbate par rapport à des sujets adultes neurophysiologiquement sains.

10 La Figure 9, relative à un prélèvement urinaire dilué 3 fois, effectué 48 h après administration d'une benzodiazépine à des fins anesthésiques, permet de noter la présence de pics anormaux d'oxydation irréversibles vers 750-800 mV/E.N.H et 1020 mV/E.N.H au premier balayage aller, difficilement exploitables quantitativement, mais surtout celle d'un important pic réversible observable à 500 mV/E.N.H sur les balayages suivants, dont la  
15 variation au cours des mictions successives permet de suivre l'excrétion du composant exogène concerné.

20 La Figure 10, relative à une urine d'opiomane, diluée 8 fois, fait apparaître de même, à 820 mV/E.N.H, au second balayage, un pic réversible qui offre la possibilité d'identifier qualitativement et quantitativement l'état d'imprégnation des patients par les drogues de structures aromatiques comme la Morphine et ses dérivés. Des pics anormaux similaires sont observés pour d'autres types de drogues de structures aromatiques, telles que les  
25 amphétamines.

30 L'invention trouve donc une application supplémentaire dans la détection des toxicomanies ou dans la recherche de substances anti-fatigue ou dopantes susceptibles d'être utilisées par des sportifs.

35

- 11 -

APPLICATION AU SUIVI DES URINES DE PATIENTS IRRADIES A DOSE ELEVEE.

5 A titre d'exemple d'application à des pathologies graves et des  
thérapeutiques lourdes, on a mené une étude visant à suivre par la  
méthode décrite, la composition en catabolites électroactifs  
détectés dans les urines de malades hospitalisés dans un service  
d'Hématologie hospitalier, qui ont subi des irradiations  
corporelles totales afin de les préparer à une greffe de moelle à  
10 visée thérapeutique pour certains types de leucémies.

Pour chaque malade, on a enregistré les voltampérogrammes  
correspondant à des échantillons d'urine prélevés avant (sur une  
diurèse de 24 h), pendant (sur le volume total recueilli pendant  
15 l'irradiation) et après irradiation (sur le volume recueilli entre  
l'arrêt de l'irradiation et le lendemain matin et sur une des  
diurèses de 24 h des jours suivants).

20 A l'examen des résultats, dont un exemple est illustré sur la  
figure 11, on a observé, pour chaque malade, des modifications  
qualitatives ou quantitatives, plus ou moins importantes,  
apparaissant pendant l'irradiation ou juste après, et allant  
toujours dans le sens d'une augmentation des quantités excrétées,  
quelquefois avec apparition de nouveaux produits.

25 La variabilité selon les individus montre à quel point, les  
réactions physiologiques des différents malades traités ont été  
différentes. Le procédé selon l'invention permet donc une  
détection rapide de l'effet du rayonnement au niveau des urines et  
30 offre la possibilité de trier les malades selon leur réaction au  
traitement. Il va de soi en particulier qu'outre l'état  
pathologique, les pré-médications auxquelles ont été soumis ces  
patients, sont susceptibles de se répercuter sur l'information que  
l'on a relevée.

35 La Figure 11 montre cette application intéressante du procédé  
selon l'invention sur les effets biologiques de l'irradiation  
corporelle d'une patiente atteinte de leucémie aiguë  
lymphoblastique. Les diagrammes a), b), c) et d) montrent

- 12 -

l'apparition de métabolites au moment de l'irradiation puis leur dépression continue au cours du temps.

#### AUTRES APPLICATIONS

5

Outre cette application à des cas cliniques et thérapeutiques relativement homogènes, on a constaté, à partir d'urines prélevées sur des individus, personnel du Laboratoire et malades hospitalisés, présentant des pathologies très diverses que les voltampérogrammes urinaires prennent des formes très variables en se modifiant parfois considérablement par :

10

- apparition de nouveaux pics

15

- ou augmentation très importantes de certains pics comme les pics d'acide urique, tyrosine et tryptophane lors de crises de goutte ou le pic correspondant au 5HIAA pour des malades atteints d'une tumeur carcinoïde.

20

- diminution de pics normalement présents s'expliquant dans certains cas par un type de médication ou par un désordre nerveux.

25

En particulier, des variations importantes par excès ou par défaut, corrélées ou non entre elles, de pics correspondant à l'ensemble 5HIAA, HVA et VMA apparaissent fréquemment sur les voltampérogrammes de patients consultants de cabinets médicaux de spécialités (Figure 13). Compte tenu de l'importance de ces composants en tant que catabolites reflétant les métabolismes de la sérotonine, de la dopamine, de l'adrénaline et de la noradrénaline, une source nouvelle de diagnostic de dépistage semble ainsi offerte par l'utilisation de cette nouvelle méthode analytique.

30

35

Cette méthode apparaît ici, complémentaire, au niveau du dépistage à faible coût, des techniques analytiques plus lourdes opérant par chromatographie de haute performance suivie d'une détection électrochimique pour les mêmes composés.

- 13 -

Ces variations de constitution urinaire, que l'on n'a pas toujours pu corréler jusqu'à présent à des pathologies précises, compte tenu de l'hétérogénéité des dossiers et de leur complexité, rendent compte par leur diversité, de la richesse de l'information apportée. Il semble donc essentiel d'exploiter ce type d'observation biochimique rapide, à faibles coûts d'équipement et d'exécution, polyvalente et automatisable, pour le suivi thérapeutique et le dépistage, en particulier d'affections cancéreuses, psychiatriques, rénales et hépatiques, ainsi que des réactions inflammatoires en général qui se manifestent par des modifications marquées de l'excrétion urinaire des composés électroactifs détectés.

Enfin, cette méthode s'avère également très utilisable pour la détection urinaire des catabolites de nombreux médicaments comportant des structures aromatiques.

## R E V E N D I C A T I O N S

L'invention a pour objet :

5

1°- Un procédé d'électro-analyse rapide des liquides biologiques permettant la détection ou le dosage dans lesdits liquides de substances chimiques organiques normales ou anormales par voltammétrie cyclique à balayage linéaire de potentiel à l'aide d'une électrode de graphite poreuse, caractérisé en ce que l'on soumet l'échantillon de liquide biologique sans séparation préalable après un premier balayage de potentiels aller et retour, à un second balayage aller et retour puis éventuellement, à un troisième balayage aller et retour et, en ce qu'on enregistre les pics correspondant aux propriétés d'oxydo-réduction nouvelles des produits de transformation chimique irréversible des formes oxydées des composés qui se trouvaient initialement et détectés lors du premier balayage aller et retour.

20

2°- Un dispositif pour la mise en oeuvre du procédé selon la revendication 1° qui comprend une cellule d'analyse qui reçoit le liquide à analyser sans purification ou séparation préliminaire, dans laquelle, est disposé un disque de verre fritté auquel est reliée une électrode constituée d'une couche de poudre de graphite compressée et d'un disque de graphite assujetti au bati de la cellule et auquel est connecté d'une manière permanente, un collecteur de courant monté d'une manière étanche à la partie inférieure de la cellule d'analyse.

30

3°- Un dispositif selon la revendication 2° dans lequel on utilise des électrodes de carbone poreuses précompactées ou frittées, simplement suspendues ou posées au contact d'un collecteur de carbone dans une cellule d'électrolyse à deux ou trois électrodes.

35

- 15 -

- 4°- Un dispositif selon l'une des revendications 2 à 3° dans lequel la cellule d'électro-analyse utilise une électrode de mesure constituée de poudre de carbone compactée avec contrôle de la force de serrage entre un collecteur de carbone massif et un disque de verre fritté et soit :
- 5
- a) une contre-électrode inattaquable et une électrode de référence
- 10
- b) seulement une contre-électrode, préférentiellement en argent chloruré, de surface suffisante pour débiter des courants de l'ordre de quelques mA sans variation notable de potentiel d'électrode.
- 15
- 5°- Un dispositif selon la revendication 4° dans lequel on utilise un générateur potentiostatique piloté pour réaliser le balayage de potentiel dans le cas de l'utilisation d'une cellule à trois électrodes ou d'un simple générateur de tension régulée avec emploi d'une cellule à deux électrodes.
- 20
- 6°- Un dispositif selon l'une des revendications 2 à 5° dans lequel on réalise une commande de potentiel et de relevé du courant par commande informatisée à l'aide d'un micro ordinateur équipé d'une interface d'entrée/sortie digitale<->analogique et exploitation informatisée des voltammogrammes obtenus pour l'identification et la mesure des concentrations des composants présents dans l'échantillon à analyser.
- 25
- 30
- 7°- Application du procédé selon la revendication 1° à la détection ou au dosage de catabolites de neuromédiateurs et des substances du métabolisme dans les liquides biologiques.
- 35
- 8°- Application du procédé selon la revendication 1° à la détection et au dosage des produits biologiques choisis dans le groupe constitué par les bases puriques, les acides aminés aromatiques, la cystéine, des protéines, les vitamines et les hormones de structure aromatique.

- 16 -

5 9°- Application du procédé selon la revendication 1° à l'étude du métabolisme de médicaments de structure aromatique par détection ou dosage dans les liquides biologiques d'un ou plusieurs produits spécifiques de l'excrétion du produit médicamenteux concerné.

10 10°- Application du procédé selon la revendication 1° à la recherche et au dosage de substances à caractère aromatique choisies dans le groupe des dérivés de la Morphine, de l'acide lysergique et des amphétamines qui consiste à rechercher, dans les liquides biologiques par électro-analyse, les substances aromatiques résultant du métabolisme des produits incriminés.

15 11°- Application du procédé selon la revendication 1° au suivi des effets physiologiques d'irradiation chez des sujets irradiés à doses élevées, qui consiste à rechercher, dans l'urine, par électro-analyse, les modifications qualitatives ou quantitatives de l'excrétion des substances physiologiques.

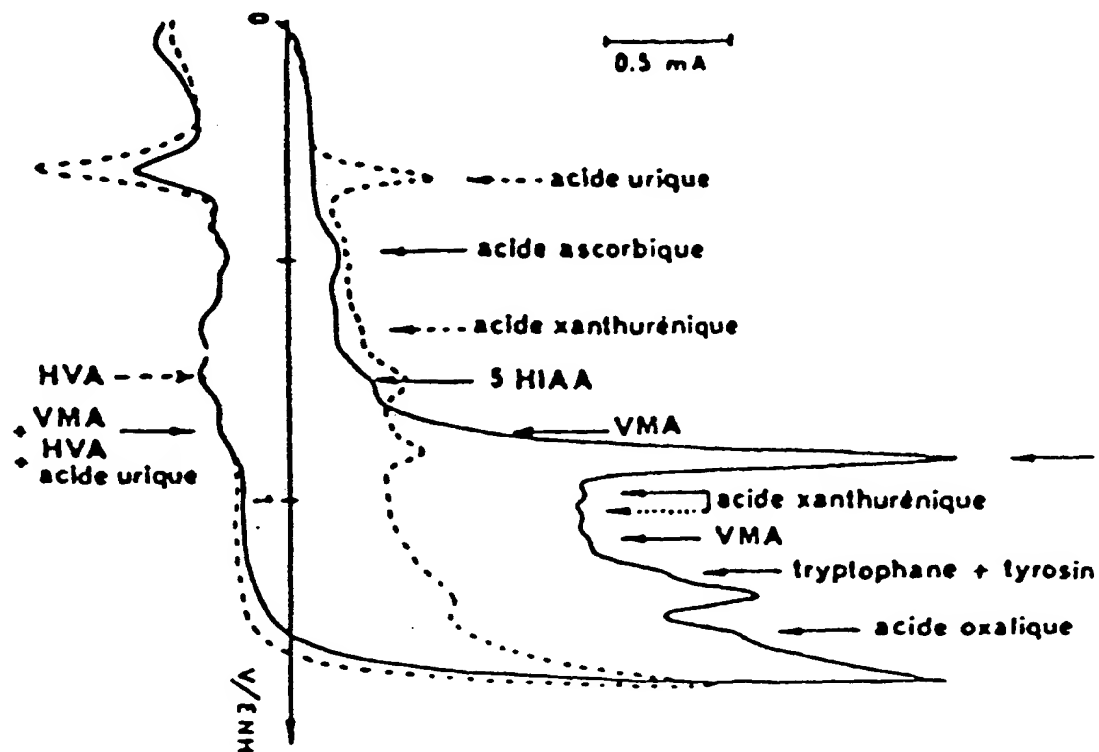
25

30

35



FIGURE 1.



Caractérisation des systèmes  
sur un voltampéromètre d'urine normale  
pH = 1 ;  $v = 1 \text{ V/20s}$  ;  
(—) 1<sup>e</sup> balayage ; (---) 2<sup>e</sup> balayage  
(—) systèmes irréversibles  
(- - -) systèmes réversibles observables au 2<sup>e</sup> balayage  
(...) contribution probable.

FIGURE 3.

— Premier Balayage  
 Aller: Retour  
 -- Deuxieme Balayage  
 Aller: Retour

2656424

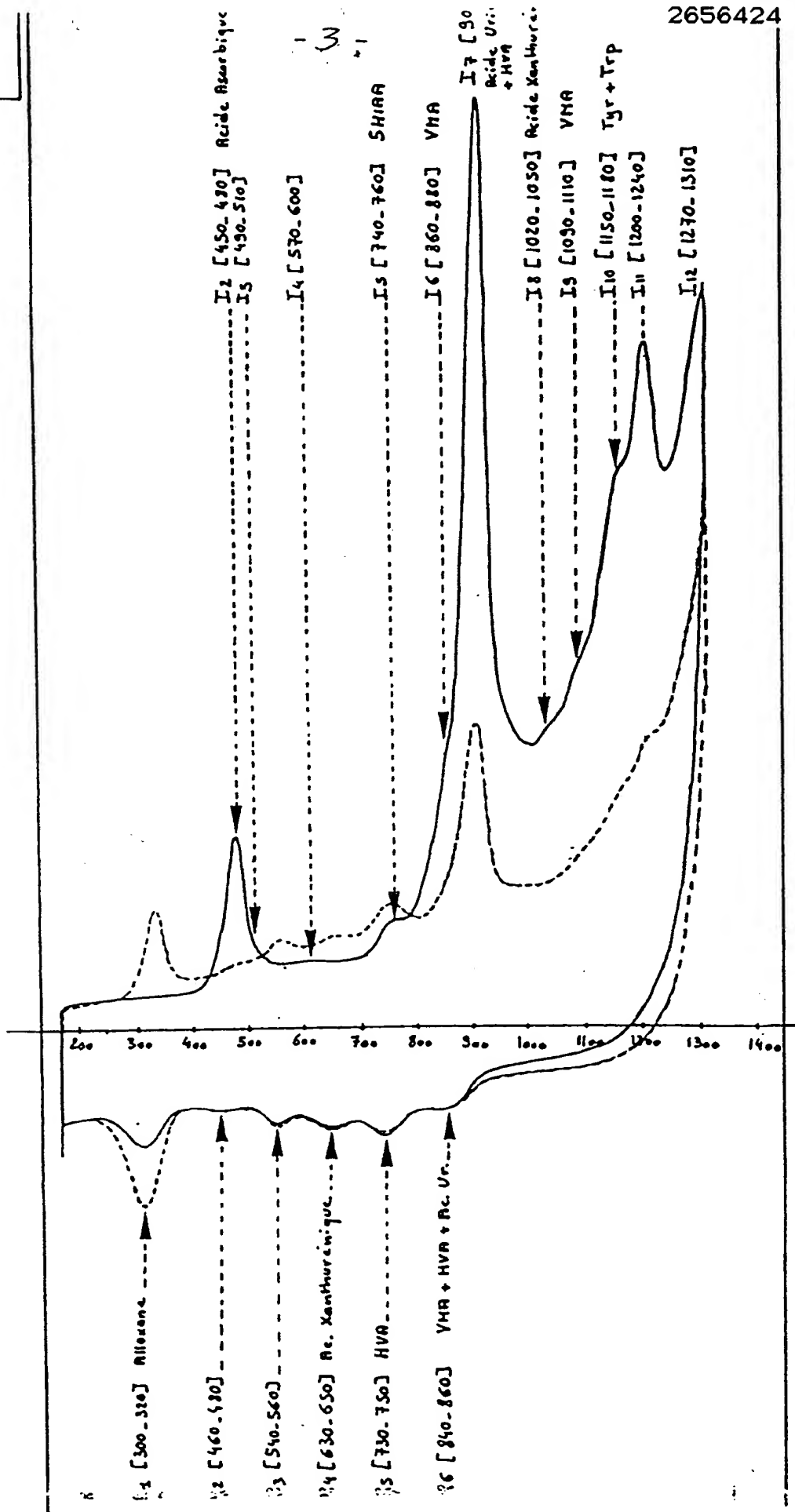


FIGURE 2.a / 2.b

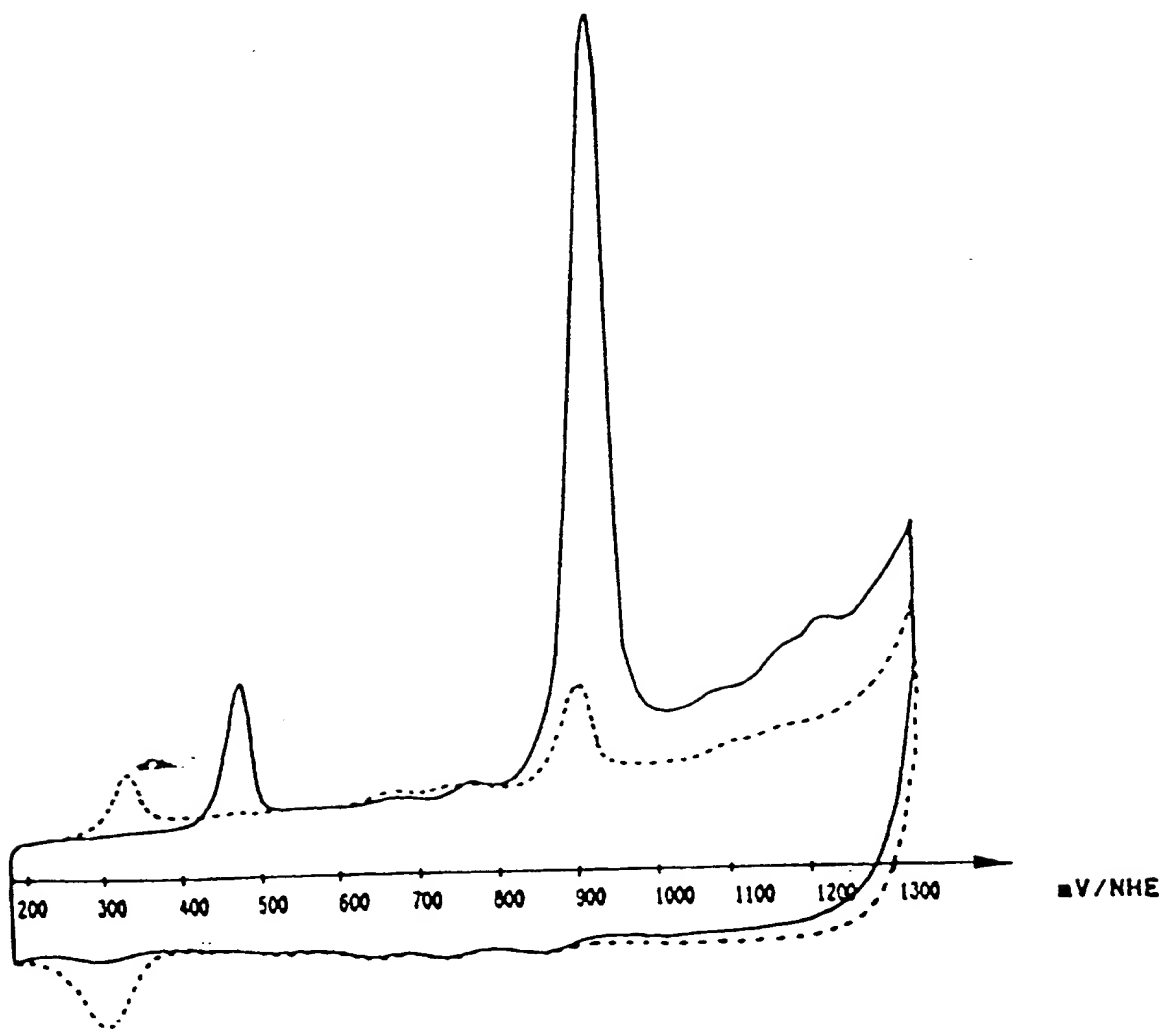


FIGURE 4.

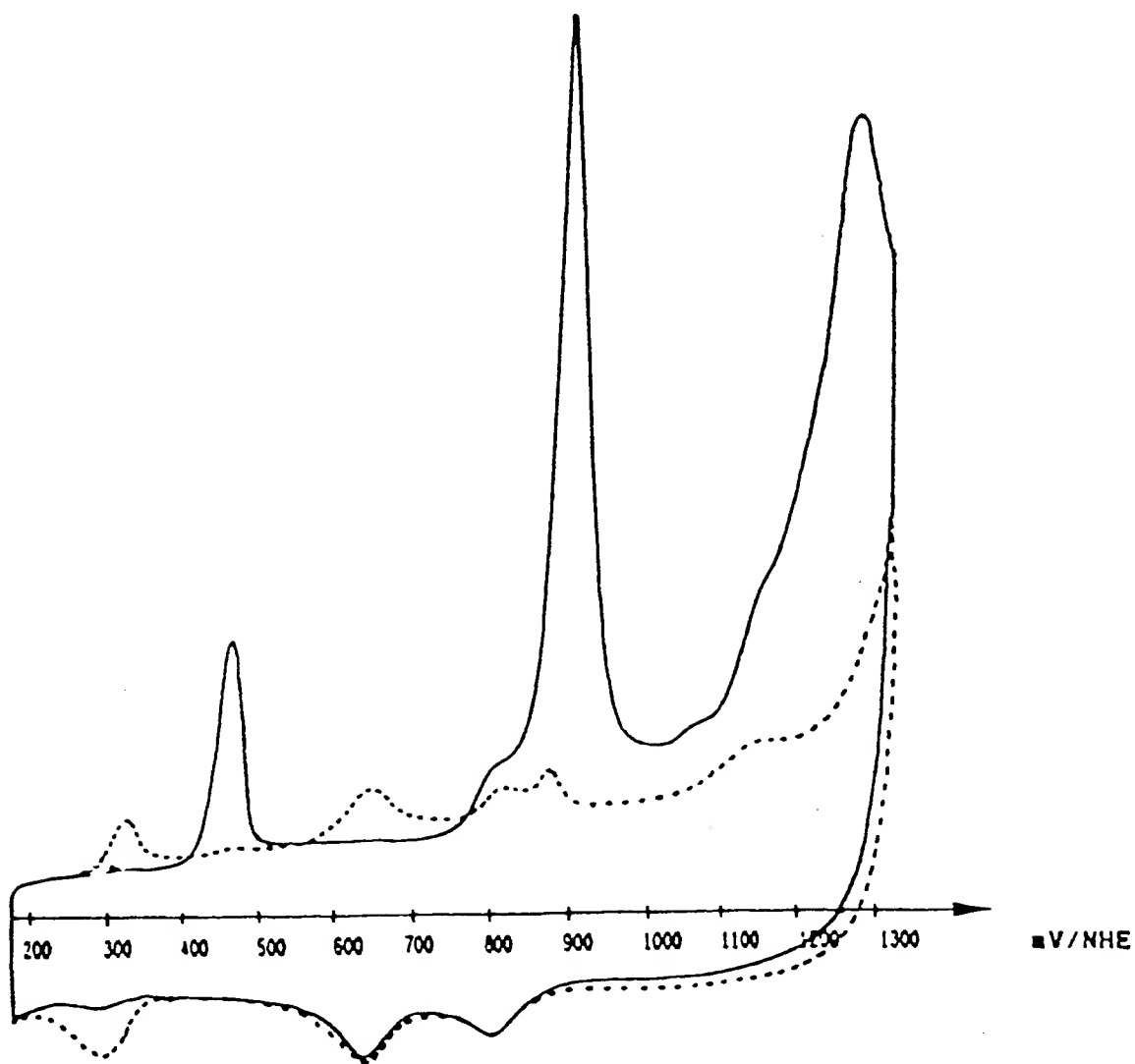


FIGURE 5.

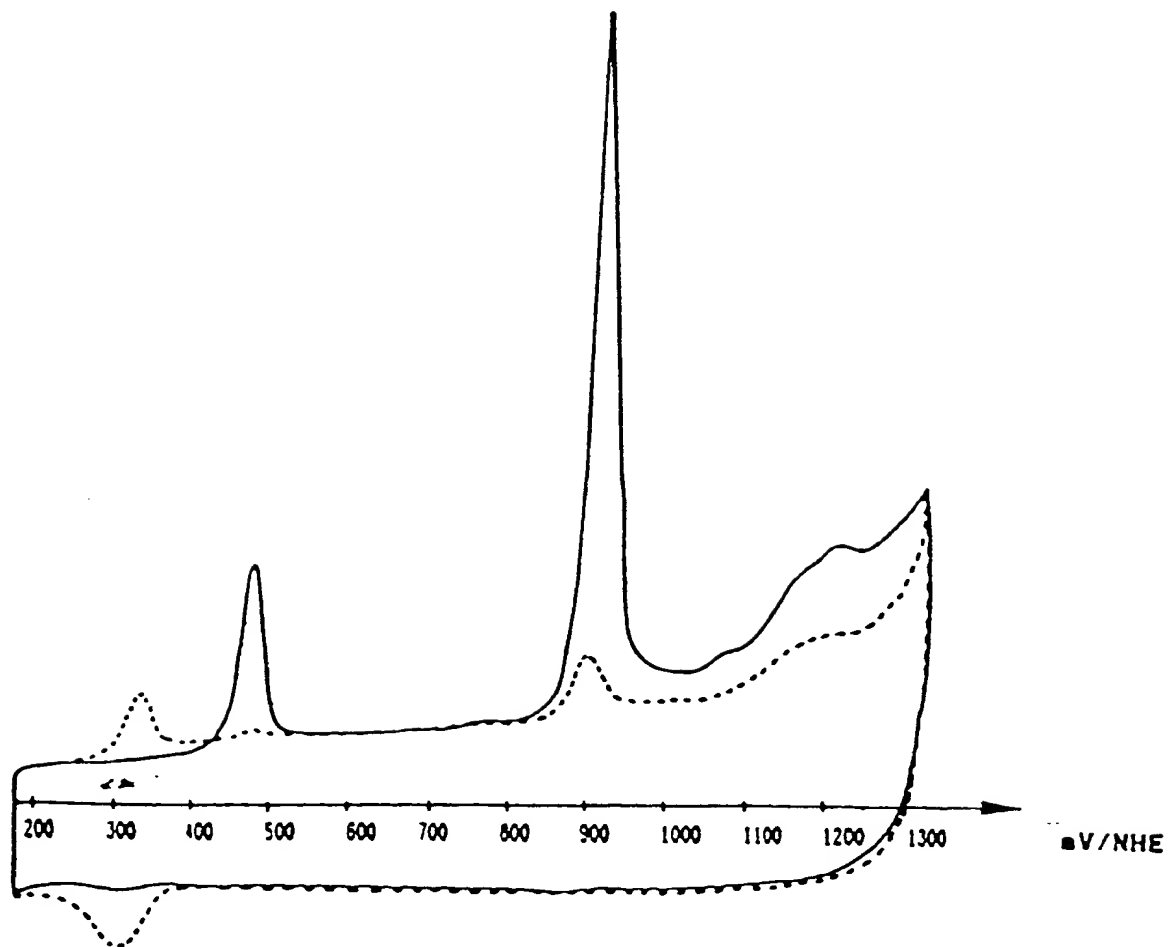
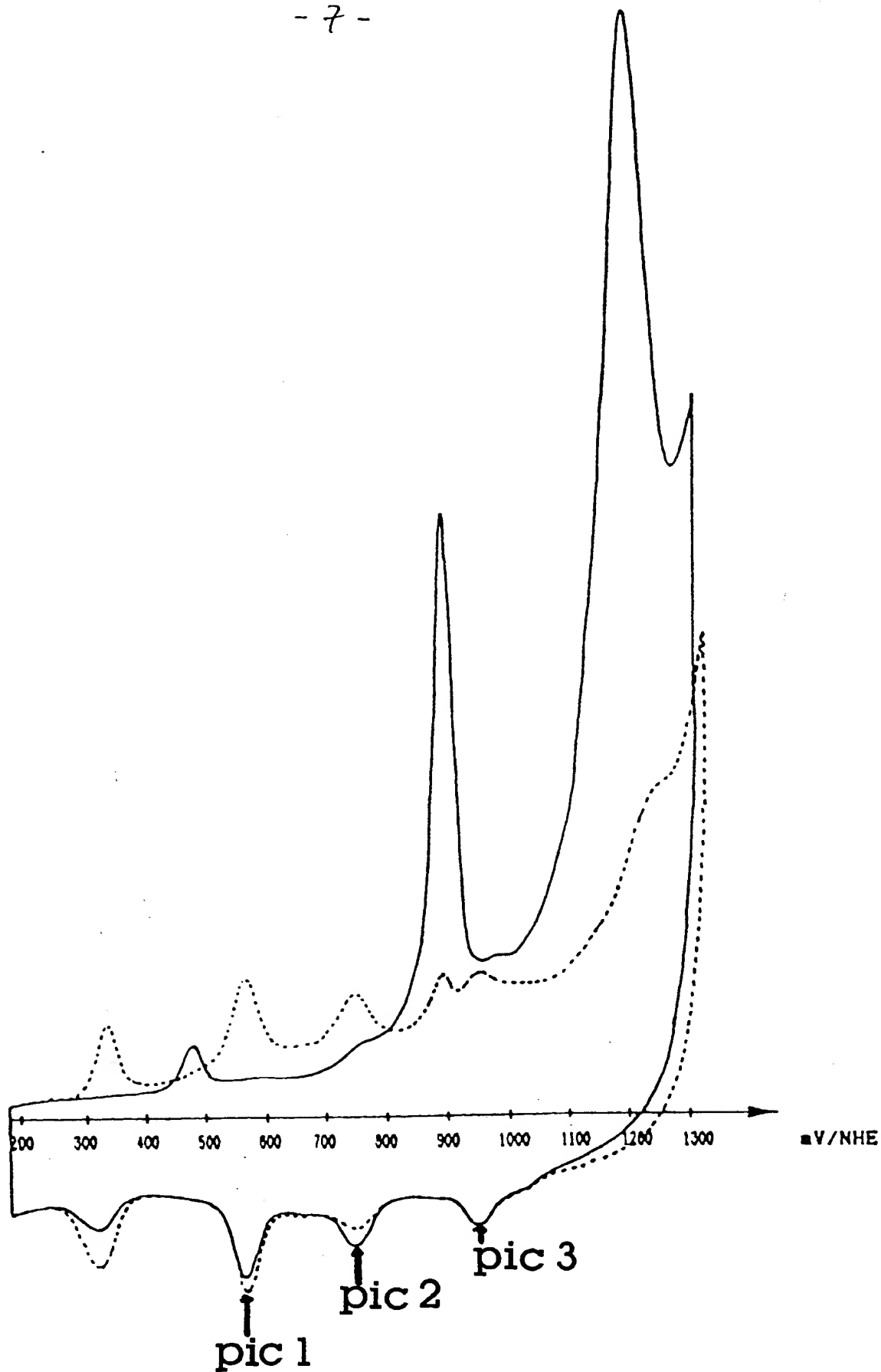


FIGURE 6.

2656424

- 7 -



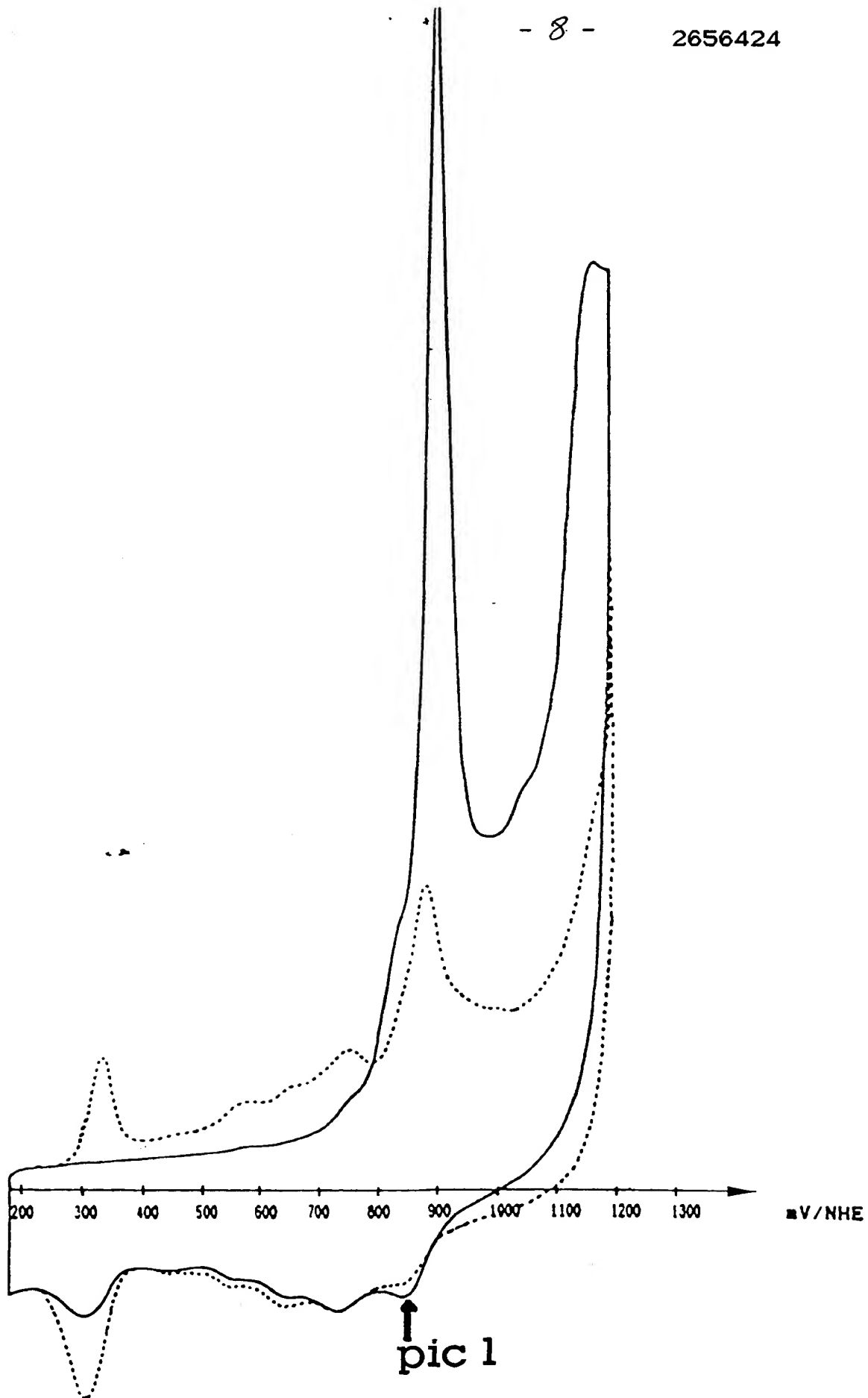


FIGURE 3.

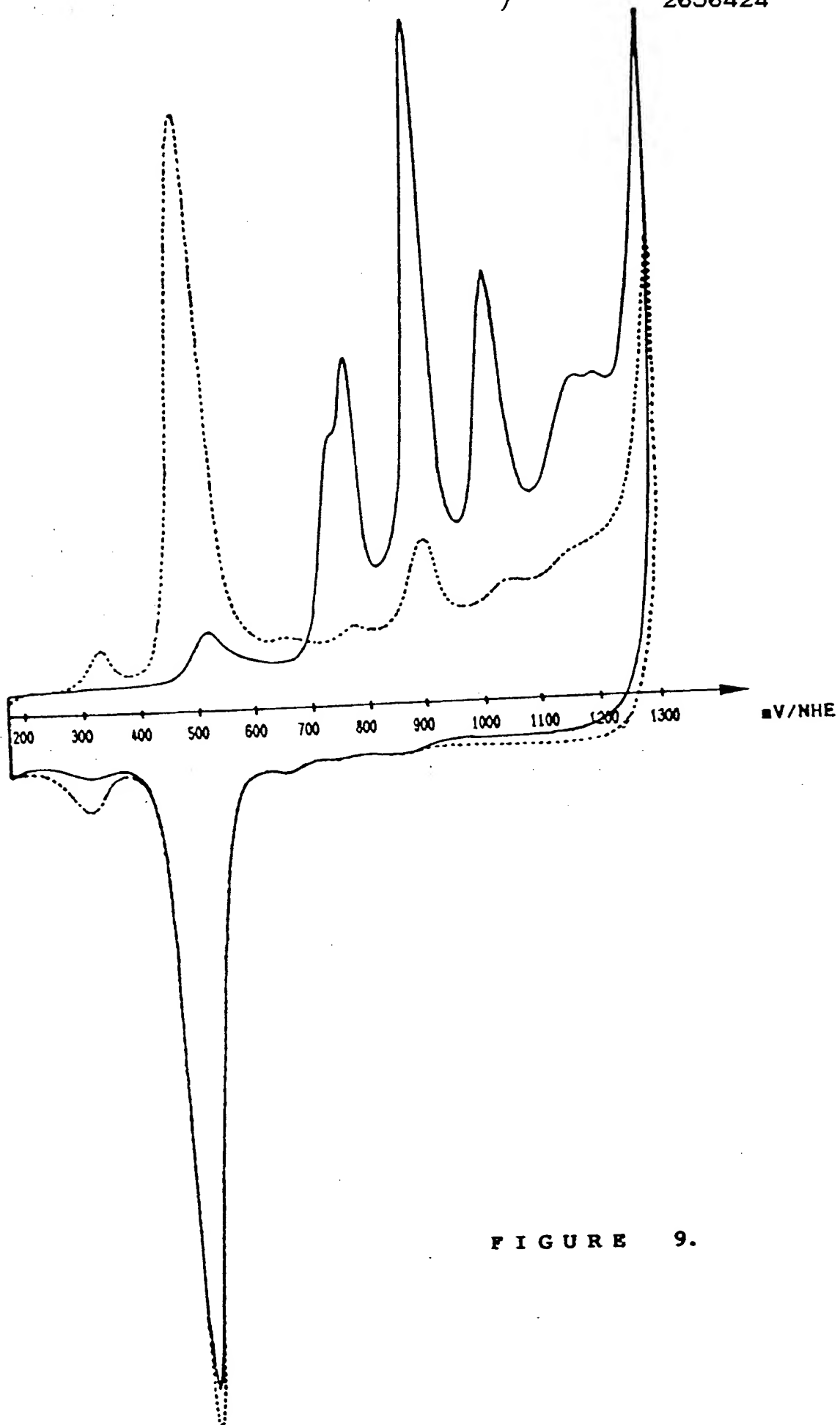


FIGURE 9.

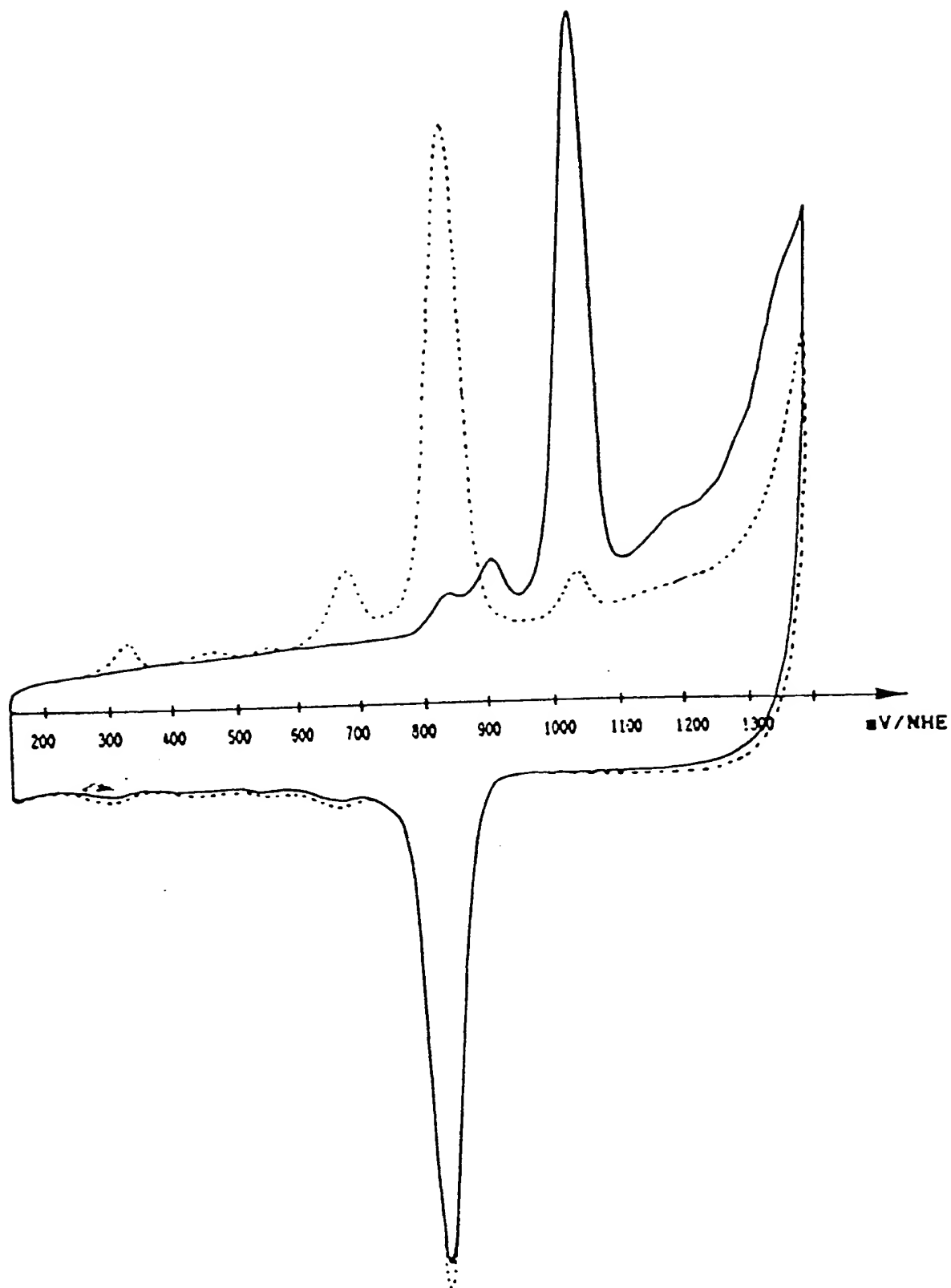
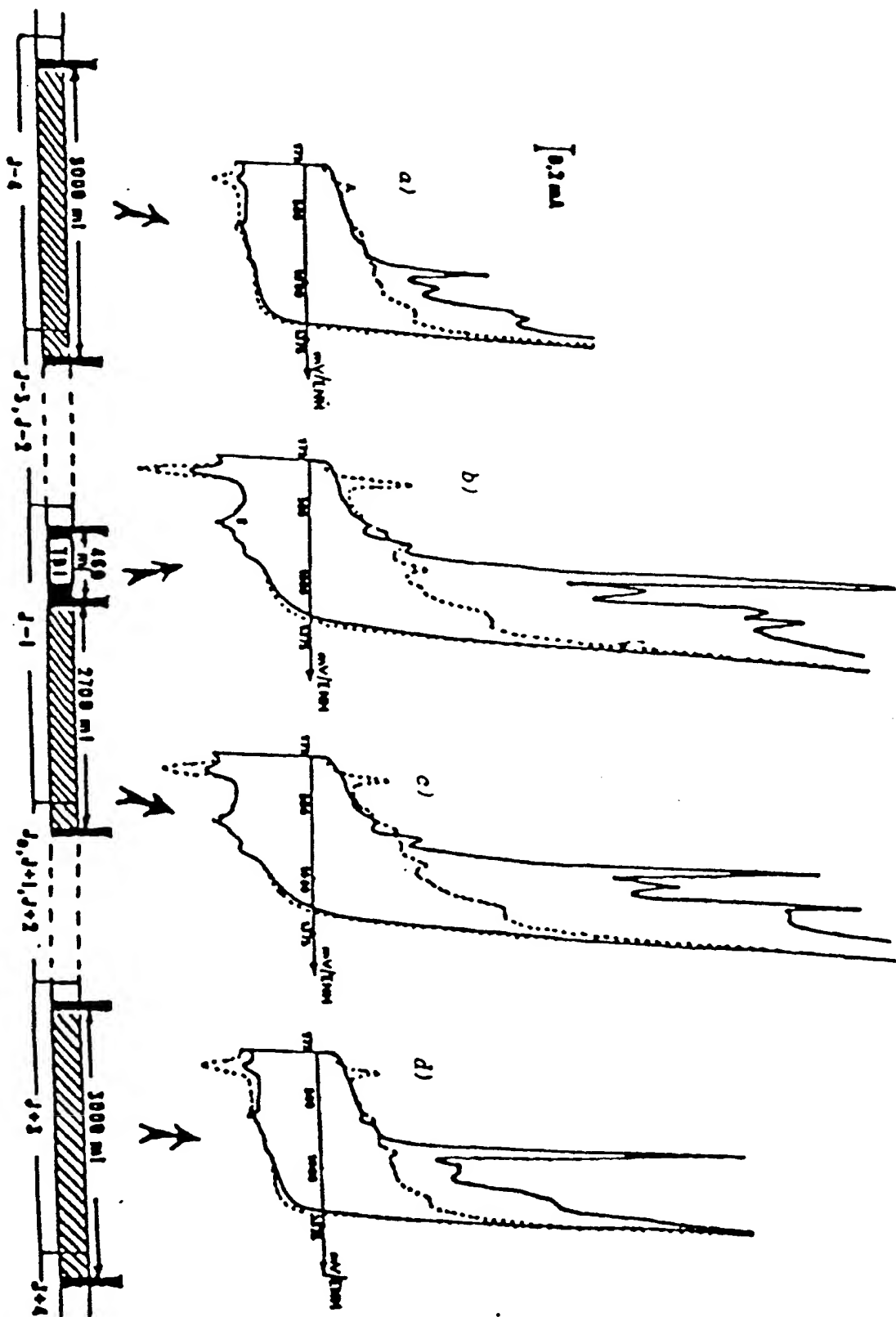


FIGURE 10.



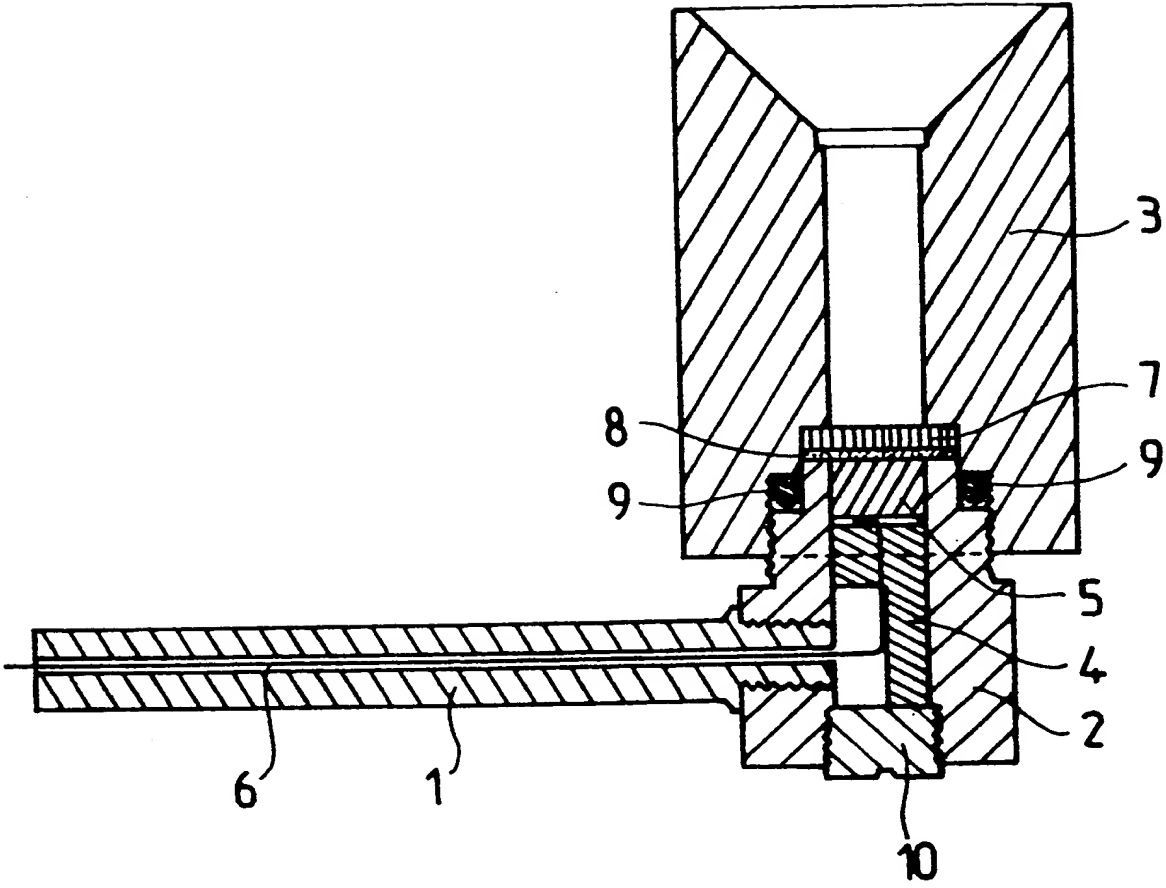
Voltampérogrammes enregistrés :

- a) avant irradiation corporelle totale (TBI)
  - b) pendant irradiation,
  - c) juste après irradiation,
  - d) quatre jours plus tard,
- sur des urines d'une patiente atteinte de leucémie aigue lymphoblastique

pH = 1 ;  $v = 1$  V/200s ; 200 mg de graphite ; (—) premier balayage  
(---) second balayage.

FIGURE 11.

12



INSTITUT NATIONAL  
de la  
PROPRIETE INDUSTRIELLERAPPORT DE RECHERCHE  
établi sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la rechercheFR 8915904  
FA 435247

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
A	CA-A-1227244 (ECCLES G.N. ET AL.) * revendications 1-3 *	1, 2
A	JOURNAL OF THE ELECTROCHEMICAL SOCIETY vol. 124, no. 2, février 1977, PRINCETON, NEW JERSEY pages 195 - 198; GOPALAKRISHNA R. et al.: "Electrochemical Studies of Antitumor Antibiotics" * le document en entier *	1, 2
A	US-A-4628463 (STURROCK P.E. ET AL.) * abrégé; figure 4 *	1, 2
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.5)
		G01N
Date d'achèvement de la recherche 22 AOUT 1990		Examineur BAROCCI S.
<b>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</b> X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons ..... & : membre de la même famille, document correspondant		

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**